

INTRODUÇÃO AO IMUNODIAGNÓSTICO

Os testes laboratoriais de imunologia podem fornecer informações importantes para o diagnóstico e cuidado clínico de pacientes. É importante salientar que os testes imunológicos podem ser usados tanto para doenças apresentando um envolvimento direto do sistema imune, quanto para doenças não imunológicas. Os testes mais estabelecidos e clássicos são voltados para a detecção de anticorpos contra parasitas, fungos, bactérias, vírus, indicando a presença de uma resposta imune contra o agente. Testes mais modernos e sensíveis podem detectar a presença de antígenos destes organismos, indicando diretamente a sua presença no hospedeiro. Os testes imunológicos podem ser utilizados, ainda, para a detecção de produtos como drogas ou hormônios, ajudando no acompanhamento clínico de pacientes.

Os usos de testes imunológicos incluem:

- a) confirmação de uma impressão clínica;
- b) diagnóstico precoce de uma doença;
- c) exclusão de determinada enfermidade;
- d) acompanhamento do progresso da doença;
- e) avaliação da efetividade da terapêutica

O teste imunodiagnóstico ideal deveria ser de fácil execução, barato e de resultado sempre preciso. Tal teste não existe. Muito poucos testes são baratos, e quase todos eles apresentam dificuldades e problemas potenciais na sua execução (e estes problemas devem ser conhecidos pelo médico que os solicita). Adicionalmente, muitos testes são usados de maneira inadequada ou interpretados erradamente.

Para evitar o uso desnecessário de testes é sempre conveniente se fazer algumas perguntas antes de solicitar um exame:

- a) O resultado do teste irá alterar o diagnóstico, prognóstico ou terapêutica utilizada?;
- b) O resultado do teste ajudará no entendimento do processo patológico?;
- c) O resultado do exame beneficiará o paciente?

Os testes imunológicos, quando divididos pela sua metodologia, podem ser agrupados em:

1. Imunoprecipitação
2. Imunoaglutinação
3. Testes utilizando o Complemento
4. Ensaio receptor-ligante
5. Imunohistologia

Podemos dividir os testes imunológicos pela sua aplicação, e neste caso teríamos:

1. Mét. para detecção de antígenos
2. Mét. para detecção de anticorpos
3. Mét. para avaliação da imunidade celular
4. Mét. de avaliação do Sistema Complemento
5. Testes de Histocompatibilidade
6. Imunohematologia

Alguns termos de uso corrente devem ser bem definidos para que sejam compreendidos e utilizados de maneira uniforme, o que facilita a comunicação. A correta interpretação destes conceitos permite o proveito máximo na utilização dos resultados dos testes laboratoriais. Estes conceitos incluem: sensibilidade, especificidade, resultado falso positivo e falso negativo, e valor preditivo.

Resultados falso positivos e falso negativos.

Quando se realiza um teste podemos dividir os indivíduos testados em 2 tópicos: a) em relação à doença em doentes e sadios; b) em relação ao teste em positivos e negativos. Isto divide os resultados em 4 categorias: verdadeiro positivos e verdadeiro negativos, e em falso positivos e falso negativos, de acordo com a tabela abaixo:

Teste	Doença	
	Presente	Ausente
Positivo	Verdadeiro Pos.	Falso Pos.
Negativo	Falso Neg.	Verdadeiro Neg.

Um resultado falso positivo é aquele que o exame se revela positivo embora o indivíduo testado não tenha a doença. Estes resultados podem ocorrer devido a problemas do teste ou do paciente.

No caso do teste isto pode ocorrer porque o ensaio reconhece uma outra substância além daquela de interesse (reação cruzada). Embora a maioria dos testes de uso corrente tenha sido testada para reatividade cruzada com muitos soros normais é possível que um determinado paciente apresente uma substância incomum e que não seja a de interesse para o diagnóstico pesquisado.

Uma outra possibilidade é que o paciente realmente tenha a substância sob teste devido a outra causa, e não tenha a doença investigada.

A utilização de valores de corte muito baixos leva ao aumento de resultados falso positivos.

No caso de resultados falso negativos (teste negativo em indivíduos que realmente apresentam a doença analisada) as causas também podem estar no paciente ou no teste.

O paciente pode estar numa fase da doença onde a substância analisada pelo teste não está presente, ou está em concentrações muito baixas.

O teste pode não ter sensibilidade analítica suficiente para detectar a substância analisada.

Não se deve esquecer que erros técnicos podem levar a resultados falso positivos ou falso negativos. Cada teste pelas suas características próprias, e reagentes empregados, possui uma série de etapas nas quais é necessário cuidado para evitar resultados falsos. A manipulação inadequada da amostra a ser analisada (exposição a temperaturas elevadas, congelamento e descongelamento frequentes, contaminação bacteriana, etc) podem levar ao consumo ou inativação da substância a ser avaliada resultando em resultados falso negativos.

Sensibilidade

É necessário distinguir os dois usos do termo sensibilidade. A **sensibilidade analítica** se refere ao limite de detecção do teste, isto é, à quantidade mínima da substância analisada capaz de ser medida. Um teste com sensibilidade analítica de 1ng/ml tem a capacidade de detectar 1ng da substância por ml de solução.

A sensibilidade analítica de diversos testes usados é mostrada na tabela abaixo:

Técnica	Sens/dL
Eletroforese proteínas séricas	100 mg
Imunoeletroforese	5-10 mg
Imunodifusão radial simples	<1-2 mg
Imunodif. dupla em ágar (Ouchterlony)	<1 mg
Fixação de Complemento	1 µg
Aglutinação	1 µg
ELISA	<1 µg
Imunofluorescência quantitativa	<1 pg
Radioimunoensaio	<1 pg

O outro uso do termo sensibilidade, ou **sensibilidade diagnóstica**, é a medida da capacidade do teste em detectar todos os indivíduos com determinada doença. Desta maneira um teste com 100% de sensibilidade seria capaz de identificar todos os pacientes portadores da doença a ser detectada pelo teste. A sensibilidade do teste é dada pela percentagem de resultados positivos em pacientes com uma determinada doença.

Sensibilidade = Verd. Positivos / Total de doentes.

Desta maneira se o teste de imunofluorescência para detecção de anticorpos anti-leishmania é positivo em 92 amostras de 100 soros de pacientes leishmaniose cutânea diz-se que a sua sensibilidade é de 92%.

É preciso estar atento ao fato de que a sensibilidade de um teste pode variar em diferentes estágios da doença. Um teste que tem sensibilidade de 100% na fase tardia da doença pode ter uma sensibilidade de 10 a 20% nas formas muito precoces da enfermidade. Isto pode ocorrer, porque a quantidade de anticorpos tende a ser pequena nos estágios iniciais de doença, resultando em testes negativos. Deve-se ainda lembrar que algumas vezes os testes laboratoriais não são necessários nos estágios avançados de certas doenças, ou porque o diagnóstico já é óbvio ou porque o tratamento pode não mais ser eficiente.

Um teste com uma sensibilidade diagnóstica muito grande pode ser mais útil na exclusão de uma hipótese diagnóstica, do que na confirmação. Isto acontece porque quando um teste é muito sensível ele se torna menos específico. Um exemplo disto acontece com o teste de anticorpos anti-nucleares (ANA) no Lupus Eritematoso Sistêmico (LES). Praticamente todos os pacientes com LES ativo não tratado apresentam uma reação de ANA positiva; sendo assim um teste extremamente sensível. O problema é que alguns indivíduos normais, ou com outras doenças, também apresentam uma reação de ANA positiva. Neste caso, uma reação de ANA positiva não indica a existência de LES, mas a presença de uma reação de ANA negativa, num paciente não tratado, torna muito improvável o diagnóstico de LES.

Especificidade

A **especificidade analítica** se refere à capacidade de um anti-soro distinguir entre dois antígenos relacionados. A **especificidade diagnóstica** se refere à capacidade do teste em ser negativo quando o indivíduo não possui a doença. A especificidade pode ser calculada como a percentagem de resultados negativos em pacientes sem a doença testada.

Especificidade = Verd. Neg. / Total de sadios

A especificidade de um teste pode ser alterada pela mudança do ponto de corte (cutoff) usado para determinar se um teste é positivo ou não. Muitos testes sorológicos são realizados com diluições seriadas dos soros testados. Numa diluição muito baixa do soro praticamente todos os soros provenientes de pacientes com a doença seriam positivos, mas é possível que alguns soros de indivíduos sem a doença também apresentem resultados positivos; nesta diluição o teste seria muito sensível, porém pouco específico. Caso se empregasse uma diluição mais alta do soro o teste poderia dar alguns resultados negativos em soros de pacientes com a doença, mas deverá conferir muito menos resultados positivos a soros de indivíduos sem a doença. O teste perderia em sensibilidade, porém se tornaria mais específico.

A tabela abaixo representa resultados hipotéticos (a percentagem dos testes positivos) de um teste sorológico para a Doença de Chagas, realizado em duas diluições dos soros de pacientes comprovadamente chagásicos e em controles negativos.

	Diluição	
	1:20	1:160
Pac.chagásicos	100%	95%
Cont.sadios	6%	1%

Caso fosse escolhida a diluição de 1:20 todos os soros de pacientes chagásicos dariam resultados positivos, mas 6% dos soros de indivíduos normais seriam positivos. Na diluição de 1:160 5% dos soros de chagásicos não seriam detectados, porém se reduziria a margem de testes positivos entre os controles negativos.

A escolha entre uma maior ou menor sensibilidade do teste, e sua relação inversa com a especificidade, depende da aplicação a ser dada. Caso o exame estivesse sendo feito para excluir soros de chagásicos entre doadores de banco de sangue, deveria se optar por uma maior sensibilidade. Nesta situação é menos grave não utilizar algumas bolsas de sangue normal do que realizar a transfusão com um sangue contaminado. Caso o teste estivesse sendo realizado para confirmar uma suspeita diagnóstica dever-se-ia optar por uma maior especificidade.

Valor preditivo.

O valor preditivo positivo de um teste indica a probabilidade de um indivíduo ter realmente a doença quando o resultado deste teste for positivo. O valor preditivo está fortemente relacionado com a sensibilidade e especificidade do teste, e é influenciado pela prevalência da doença.

Valor preditivo positivo = Verd. Pos. / Total de positivos no teste.

A influência da prevalência no valor preditivo pode ser observada facilmente no exemplo abaixo. Um teste com 99% de especificidade e 99% de sensibilidade para a doença de Chagas resulta em que de cada 100 chagásicos testados 99 terão resultado positivo, e de cada 100 indivíduos sem a doença somente 1 terá um resultado positivo.

Caso este teste fosse aplicado em 100.000 pessoas numa população (A) onde a prevalência da doença de Chagas fosse de 1:10 (10%) teríamos 9900 testes positivos entre os 10.000 chagásicos (100 casos seriam de resultados falso negativos), e 900 resultados falso positivos entre as 90.000 pessoas sem a doença de Chagas. Havendo 10 vezes mais resultados positivos entre os chagásicos que entre os indivíduos sem a doença.

No caso do mesmo teste ser aplicado em 100.000 indivíduos numa população (B) onde a frequência da doença de Chagas fosse de 1:1.000 (0,1%) a situação seria bem diferente. Teríamos 99 resultados positivos entre os 100 chagásicos, e 999 resultados positivos entre os 99.900 indivíduos sem a doença. Deste modo teríamos 10 vezes mais testes positivos na população sem a doença do que nos chagásicos.

Na maior parte das vezes o valor preditivo de um teste pode ser grandemente ampliado quando solicitado de forma criteriosa. A prevalência da doença na população de indivíduos apresentando quadro clínico específico é bem mais elevada que na população em geral. No exemplo acima, se na população B o valor preditivo positivo fosse calculado apenas entre os indivíduos com sinais e/ou sintomas da Doença de Chagas teríamos um resultado bem diferente.

O valor preditivo negativo é a fração de testes normais que significam ausência de doença.

Valor preditivo neg. = Verd. Neg. / Total de negativos no teste.